

INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEM

Patent Number: ☐ [WO0012741](#)
Publication date: 2000-03-09
Inventor(s): MEHTALI MAJID (FR); SORG-GUSS TANIA (FR)
Applicant(s): MEHTALI MAJID (FR); SORG GUSS TANIA (FR); TRANSGENE SA (FR)
Requested Patent: ☐ [FR2782732](#)
Application Number: WO1999FR02051 19990827
Priority Number(s): FR19980010842 19980828
IPC Classification: C12N15/861; C12N15/62; C12N5/10; A61K48/00
EC Classification: [C12N15/861](#)
Equivalents: AU5426299, CA2341775, ☐ [EP1108051](#) (WO0012741), [A3](#), [A3](#), JP2002523106T
Cited Documents: [WO9837185](#); [WO9731108](#); [WO9738117](#); [EP0316717](#); [WO9744475](#); [WO9630512](#)

Abstract

The invention concerns an inducible expression system using nucleotide sequences coding for a transcriptional activator of eukaryotic or viral origin and a recombinant adenoviral vector comprising a gene of interest placed under the control of a promoter inducible in trans by said transcriptional activator. The invention also concerns a recombinant adenoviral vector bearing a first expression cassette coding for a transcriptional activator and a second cassette bearing a gene of interest placed under the control of a promoter inducible in trans by said transcriptional activator. The invention further concerns an infectious viral particle, its preparation method, a eukaryotic cell and a pharmaceutical composition comprising such a vector or expression system as well as their use for therapeutic or prophylactic purposes.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 782 732

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

98 10842

⑤1 Int Cl⁷ : C 12 N 15/11, C 12 N 15/861, 5/10, A 61 K 48/00 //
A 61 P 35/00, 31/12, 9/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 28.08.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 03.03.00 Bulletin 00/09.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *TRANSGENE SA Société anonyme —
FR.*

⑦2 Inventeur(s) : MEHTALI MAJID et SORG GUSS
TANIA.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 **SYSTEME D'EXPRESSION INDUCTIBLE.**

⑤7 La présente invention concerne un système d'expression inductible mettant en oeuvre les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel d'origine eucaryote ou virale et un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible en trans par ledit activateur transcriptionnel. Elle a également pour objet un vecteur adénoviral recombinant portant une première cassette d'expression codant pour un activateur transcriptionnel et une seconde cassette portant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible en trans par ledit activateur transcriptionnel. L'invention a également trait à une particule virale infectieuse, son procédé de préparation, une cellule eucaryote et une composition pharmaceutique comprenant un tel vecteur ou système d'expression ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques ou prophylactiques.

FR 2 782 732 - A1



La présente invention concerne un système d'expression inductible mettant
5 en oeuvre les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel
et un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le
contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur transcriptionnel
sous une forme activée. Elle a également pour objet un vecteur adénoviral
10 recombinant portant une première cassette d'expression codant pour ledit
activateur transcriptionnel et une seconde cassette portant un gène d'intérêt placé
sous le contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur
transcriptionnel. L'invention a également pour objet une particule virale
infectieuse, une cellule, une composition pharmaceutique comprenant un tel
15 vecteur ou système d'expression ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques
ou prophylactiques. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des
perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

La thérapie génique se définit comme le transfert d'information génétique
dans une cellule ou un organisme hôte. Le premier protocole appliqué à l'homme
a été initié aux Etats Unis en septembre 1990 sur un patient génétiquement
20 immunodéficient en raison d'une mutation affectant le gène codant pour l'Adénine
Désaminase (ADA). Il s'agissait de corriger ou remplacer le gène défectueux dont
le dysfonctionnement est à l'origine d'une maladie génétique par un gène
fonctionnel. Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le
développement de cette technologie qui a été depuis étendue au traitement d'autres
25 maladies aussi bien génétiques qu'acquises (cancers, maladies infectieuses comme
le SIDA...) dans le but de délivrer *in situ* des gènes thérapeutiques améliorant la
pathologie. La plupart des stratégies utilisent des vecteurs pour véhiculer le gène
thérapeutique vers sa cible cellulaire. De nombreux vecteurs tant viraux que
synthétiques ont été développés au cours de ces dernières années et ont fait l'objet

de nombreuses publications accessibles à l'homme du métier.

L'intérêt des adénovirus à titre de vecteurs de thérapie génique a déjà été évoqué dans de nombreux documents de l'art antérieur. Ils infectent de nombreux types cellulaires, aussi bien des cellules en division que quiescentes, sont non
5 intégratifs et peu pathogènes. En outre, ils possèdent un tropisme naturel pour les voies respiratoires. Ces propriétés particulières font des adénovirus des vecteurs de choix pour de nombreuses applications thérapeutiques et même vaccinales. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une molécule d'ADN linéaire et bicaténaire d'environ 36 kb qui porte une trentaine de gènes intervenant dans le
10 cycle viral. Les gènes précoces (E1 à E4 ; E pour early en anglais) sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome. Les régions E1, E2 et E4 sont essentielles à la réplication virale alors que la région E3 impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire anti-adénovirus chez l'hôte ne l'est pas. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late signifiant tardif en anglais) codent majoritairement pour les
15 protéines de structure et recouvrent en partie les unités de transcription précoces. Ils sont pour la plupart transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais). En outre, le génome adénoviral porte à ses extrémités des régions agissant *en cis* essentielles à l'encapsidation constituées de séquences terminales inversées (ITR) situées aux extrémités 5' et 3' et d'une région
20 d'encapsidation qui suit l'ITR 5'.

Les vecteurs adénoviraux actuellement utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont dépourvus de la majeure partie de la région E1 afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. Des délétions supplémentaires dans la région E3 permettent d'accroître les capacités de clonage.
25 Les gènes d'intérêt sont introduits dans l'ADN viral à la place de l'une ou l'autre région délétée. Cependant, l'immunogénécité potentielle des protéines virales encore exprimées peut dans certaines applications particulières s'opposer à la persistance des cellules transduites et à l'expression stable du transgène. Ces inconvénients ont justifié la construction de vecteurs de nouvelles générations qui

conservent les régions *en cis* (ITRs et séquences d'encapsidation) essentielles à l'encapsidation mais comportent des modifications génétiques supplémentaires visant à supprimer l'expression *in vivo* de la plupart des gènes viraux (voir par exemple la demande internationale WO94/28152). A cet égard, un vecteur dit
5 minimal, déficient pour l'ensemble des fonctions adénovirales représente une alternative de choix.

La plupart des vecteurs développés à l'heure actuelle sont basés sur une expression constitutive du transgène. Or il peut être souhaitable de limiter l'expression du gène thérapeutique à un nombre restreint de types cellulaires.
10 L'expression tissu-spécifique peut être médiée par le biais de promoteurs et d'enhancers tissu-spécifiques ou de systèmes d'expression inductibles répondant à un événement cellulaire ou temporel spécifique.

De nombreux systèmes d'expression inductibles proposés actuellement reposent sur l'emploi de promoteurs régulés par des facteurs de transcription endogènes activés par un ligand inducteur particulier (hormones stéroïdes, interféron, métaux lourds...). Un premier inconvénient est que ces systèmes nécessitent la présence des facteurs activateurs endogènes au sein de la cellule cible. De plus, le niveau d'expression basal est souvent élevé en raison d'une activation «bruit du fond» due aux substances cellulaires endogènes, qui peut
15 générer des effets secondaires non négligeables.
20

Un certain nombre de systèmes d'expression basés sur l'utilisation de facteurs procaryotiques ont été mis en évidence au cours de ces dernières années. On peut citer par exemple ceux des opérons bactériens tétracycline (Gossen et Bujard, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547-5551), lactose (Miller et
25 Reznikoff (Eds), The operons, Cold Spring Harbor Laboratory), tryptophane (Yanofsky et al., 1981, Nucleic acids Res. 9, 6647-6668), de la protéine 16 du virus simplex de l'herpès (protéine *trans*-activatrice VP16), ou de la protéine Gal4 de levure (Webster et al., 1988, Cell 52, 169-178).

D'une manière générale, l'opéron de résistance à la tétracycline est codé par

le transposon Tn10 (Hillen et al., 1984, J. Mol. Biol. 172, 185-201). La régulation est assurée par une courte séquence nucléotidique dite "opérateur" (tet O) qui constitue un site de fixation de divers régulateurs. Ainsi, la fixation du répresseur tétracycline (tet R) ou de l'antibiotique tétracycline diminue considérablement le niveau de transcription. Au contraire, un effet d'activation est obtenu en mettant en oeuvre une protéine, désignée dans la littérature "trans-activateur tétracycline (tTA)" qui résulte de la fusion entre le tet R et les 130 acides aminés C-terminaux du domaine d'activation de la protéine VP16 du virus simplex de l'herpès. L'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de plusieurs copies de tet O en amont de séquences de base de la transcription (TATA box, site d'initiation de la transcription..) est détectable par co-expression du tTA et inhibée par ajout de tétracycline. La Tétracycline lie le tTA et empêche ainsi la transcription. Ce système est fonctionnel dans un contexte vecteur rétroviral (Paulus et al., 1996, J. Virol. 70, 62-67) et adénoviral (Neering et al., 1996, Blood 4, 1147-1155 ; Yoshida and Hamada, 1997, Biochem. Biophys. Comm. 230, 426-430 ; Massie et al., 1998, J. Virol. 72, 2289-2296). Dans ce dernier cas, le trans-activateur est fourni *en trans* soit par infection d'une lignée établie exprimant le tTA par un vecteur adénoviral contenant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'éléments *tetO* et du promoteur CMV soit par co-infection des cellules par deux vecteurs adénoviraux, l'un contenant la cassette d'intérêt et l'autre exprimant le tTA. Un système reverse dans lequel l'expression du transgène est activée en présence de la tétracycline, a été développé en mutant la protéine de fusion tTA (Gossen et al., 1995, Science 268, 1766-1769). La protéine modifiée rtTA ne lie en effet les éléments *tetO* qu'en présence de tétracycline. Une autre variante selon laquelle l'expression est contrôlée à deux niveaux (en absence de tétracycline et en présence d'oestradiol), est obtenue en fusionnant le tTA au domaine de liaison au ligand du récepteur aux oestrogènes (Iida et al., 1996, J. Virol. 70, 6054-6059).

Un autre système inductible repose sur l'emploi de récepteurs endogènes afin de remédier à l'immunogénicité potentielle des trans-activateurs

procaryotiques. A cet égard, les récepteurs des hormones stéroïdes ont fait l'objet de nombreuses publications. On peut citer plus particulièrement les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) (Israël et Kaufman, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17, 4589-4604), à la progestérone (PR) (Gronemeyer et al., 1987, *EMBO J.* 6, 3985-3994) et aux oestrogènes (ER) (Klein-Hitpaß et al., 1986, *Cell* 46, 1053-1061 ; Koike et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15, 2499-2513). Leur mode d'action est variable puisqu'ils sont capables de trans-activer ou de trans-réprimer la transcription selon la cellule cible, le ligand hormonal et les éléments de régulation employés. Pour ce qui est de la trans-activation, le récepteur stéroïdien est sous sa forme inactive complexé à divers facteurs cellulaires dont certaines protéines de choc thermique (hsp pour heat shock protein en anglais). La fixation d'un ligand agoniste (hormone stéroïde) entraîne un changement de la conformation du récepteur. Cette activation s'accompagne de la dissociation des facteurs cellulaires, d'une translocation nucléaire et augmente la capacité du récepteur à fixer une courte séquence d'ADN spécifique (séquence cible), ce qui permet l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle et l'induction de la transcription. Pour remplir leur fonction, ces récepteurs sont généralement organisés en 3 domaines fonctionnels, respectivement un domaine de trans-activation permettant l'activation de la transcription, un domaine de liaison à l'ADN (séquence cible) et un domaine de liaison au ligand (DLL).

Des récepteurs modifiés répondant préférentiellement à des ligands synthétiques non naturels sont également proposés dans la littérature. Par exemple, Wang et al. (1994, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 8180-8184) ont construit une chimère activable par la molécule RU486 mais pas par la progestérone endogène, qui résulte de la fusion du domaine de liaison au ligand du récepteur tronqué de la progestérone (Δ PR), du domaine de liaison à l'ADN de la protéine de levure Gal4 et du domaine de trans-activation de la protéine VP16. Toutefois, l'activité basale reste élevée et la protéine chimère peut potentiellement interférer avec les facteurs transcriptionnels cellulaires. Des variants des récepteurs ER et GR modifiés dans

leurs domaines de liaison au ligand ont également été décrits. Ainsi, le mutant ER^T obtenu par substitution de la glycine en position 521 du récepteur ER par une arginine, est incapable de fixer les oestrogènes endogènes, mais peut être activé par des ligands synthétiques tel que le Tamoxifen, pour activer la transcription régulée
5 par la séquence cible ERE (pour estrogen responsive element). Un variant analogue a également été construit pour le récepteur GR, modifié en position 747 par substitution de l'isoleucine par une thréonine (Roux et al., 1996, Molecular Endocrinology 10, 1214-1226). Ce variant désigné GR^{dec} est incapable de fixer les glucocorticoïdes endogènes, mais peut être activé par des ligands synthétiques tels
10 que la Dexaméthasone. Une fois activé, il reconnaît la séquence cible GRE (pour glucocorticoïde responsive element ; Cato et al., 1986, EMBO J. 5, 2237-2240) et stimule la transcription du promoteur qui lui est associé.

Un autre système d'expression inductible utilise le récepteur stéroïdien d'insecte répondant à l'ecdysone (EcR). Le récepteur est activé par l'ecdysone et
15 forme un hétérodimère avec la protéine ultraspiracle (USP) de la Drosophile qui se fixe à une séquence cible spécifique (EcRE pour ecdysone responsive element) pour activer la transcription. No et al. (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3346-3351) ont créé un récepteur mutant VgEcR obtenu par fusion du DLL du récepteur EcR, d'un hybride entre le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs
20 EcR et GR et du domaine de *trans*-activation de VP16. Le mutant peut former, en présence de l'ecdysone ou de son analogue muristone A, un hétérodimère avec la protéine USP ou son homologue humain, le récepteur de l'acide rétinoïque X (RXR), et activer la transcription de gènes placés sous le contrôle d'une séquence hybride (5xE/GRE) comprenant les motifs répondant aux récepteurs EcR et GR.
25 Un tel système évite une éventuelle activation endogène.

Un autre système d'expression inductible décrit dans la littérature met en oeuvre les immunophilines. Rivera et al. (1996, Nat. Med. 2, 1028-1032) ont développé un système à deux composantes assemblées en présence d'un ligand. Plus précisément, la première composante est une fusion entre le facteur de

transcription ZFHD1 (portant un domaine de liaison à l'ADN) et l'immunophiline FKBP12 et la deuxième composante est une fusion entre le domaine de trans-activation du facteur NF κ B p65 et FRAP (FKBP12-rapamycine-associated protein). Le trans-activateur est activé sous forme d'un hétérodimère associant les deux composantes et la rapamycine liant les portions FKBP12 et FRAP qui peut induire l'expression d'un transgène placé sous le contrôle des éléments-cibles de ZFHD1.

Enfin, Dolwick et al. (1993, Mol. Pharmacol. 44, 911-917) ont identifié le récepteur aryl hydrocarbon (AhR) impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques et des substances chimiques élaborées par l'homme. L'AhR, sous forme inactive est complexé à divers facteurs cellulaires dont la protéine chaperonne hsp90. La fixation d'un ligand xénobiotique induit la dissociation du complexe, la translocation du AhR dans le noyau, la formation d'un hétérodimère avec la protéine Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ; Hoffman et al., 1991, Science 252, 954-958). La fixation de l'hétérodimère sur les éléments cibles de l'ADN nommés XRE (pour xenobiotique responsive elements) induit la transcription des séquences géniques en aval. La séquence XRE est présente dans la région promotrice de nombreux gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme de drogues, telles que glutathione-S-transférase ou cytochrome P4501A1. AhR et Arnt possèdent un domaine responsable de la reconnaissance de la séquence cible, de l'hétérodimérisation et de la liaison au ligand. La majorité des études de trans-activation par le biais du complexe AhR/Arnt utilise le ligand 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD)

La présente invention propose un système d'expression inductible mettant en oeuvre un vecteur adénoviral comportant un gène d'intérêt dont l'expression est régulée par un trans-activateur activable par l'apport de molécules pharmacologiques exogènes. Ce système est basé plus particulièrement sur l'utilisation d'un récepteur stéroïdien. Une fois activé, le complexe récepteur/ligand va se fixer sur sa séquence cible et permettre une activation *en trans* de

l'expression du gène thérapeutique. On a maintenant construit un vecteur adénoviral recombinant contenant, en remplacement de la région E1, une cassette d'expression du récepteur stéroïdien mutant GR^{dex} exprimé de façon constitutive par le promoteur précoce du cytomégalovirus (CMV) et, en remplacement de la

5 région E3, une cassette d'expression du gène facteur IX (FIX) humain placé en aval du promoteur du virus MMTV (mouse mammary tumor virus) contenant la séquence cible GRE. Les expériences qui suivent montrent la fonctionnalité d'un tel système inductible *in vitro* et *in vivo*. De façon analogue, le récepteur ER^T a également été inséré dans la région E1 d'un adénovirus sous le contrôle du

10 promoteur CMV. Dans ce cas, la cassette inductible du gène FIX est régulée par la séquence ERE associée au promoteur minimal du gène TK (thymidine kinase) de HSV (herpès simplex virus). Le troisième système étudié dans le cadre de la présente invention met en oeuvre le récepteur modifié VgEcR et le récepteur humain RXR dont les séquences ont été introduites dans la région E1 d'un

15 adénovirus. La cassette inductible présente dans la région E3 place l'ADNc du FIX sous le contrôle des éléments hybrides 5xE/GRE.

La finalité de la présente invention est de remédier aux inconvénients des vecteurs de thérapie génique actuels, en améliorant notamment la spécificité (activation par des substances exogènes non toxiques et non par des facteurs

20 cellulaires endogènes) et l'inductibilité (activité basale en l'absence d'inducteur minimale et forte expression du transgène à l'état activé). L'objet de la présente invention peut être appliqué à divers protocoles de thérapie génique nécessitant l'expression de molécules solubles, telles que des molécules antitumorales (anticorps, cytokines, chimiokines) ou dans tous les cas où l'expression du gène

25 thérapeutique devra être régulée en fonction des besoins de l'organisme. Il permet également l'analyse des gènes dont l'expression est cytotoxique ou réduite à certaines étapes du développement.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un système d'expression

inductible comprenant :

- 5 (i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel d'origine eucaryote ou virale et placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte , et
- (ii) un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

Aux fins de la présente invention, le terme «activateur transcriptionnel»

10 définit un polypeptide ou un ensemble de polypeptides exerçant une action positive sur la transcription c'est à dire ayant la capacité d'initier ou de stimuler la transcription d'un gène quelconque à partir d'éléments de régulation appropriés répondant audit activateur transcriptionnel. L'effet positif sur la transcription est de préférence médié directement par la liaison de l'activateur aux éléments de

15 régulation mais peut l'être indirectement par l'intermédiaire de facteur(s) cellulaire(s). De préférence, on a recours à un activateur transcriptionnel ligand-dépendant apte à lier une séquence d'ADN caractéristique (séquence cible) et à activer le promoteur qui lui est associé. De tels activateurs transcriptionnels sont décrits dans l'état de la technique. On indique également que dans le cadre de la

20 présente invention, l'activateur transcriptionnel peut être un polypeptide unique sous forme de monomère ou de multimère (de préférence dimère) ou encore peut résulter de l'association d'un ensemble de polypeptides formant un hétéromère (de préférence un ensemble de deux polypeptides formant un hétérodimère). L'activateur transcriptionnel en usage dans la présente invention peut être dérivé

25 d'un organisme quelconque d'origine eucaryote ou virale, notamment d'une levure, d'un insecte, d'un vertébré ou d'un virus ou peut avoir une origine mixte c'est à dire être formé de composantes d'origines diverses.

Un activateur transcriptionnel convenant à la mise en oeuvre de la présente invention comprend au moins 3 types de domaines fonctionnels, respectivement un

domaine de trans-activation, un domaine de liaison à l'ADN (séquence cible) et un domaine de liaison au ligand (DLL). Dans le cadre de la présente invention, l'ordre des différents domaines est sans importance. De plus, ils peuvent être répartis dans la séquence en acides aminés de manière continue ou discontinue (avec éventuellement un chevauchement des résidus impliqués dans chaque fonction) et localisés sur un ou les polypeptide(s) formant ledit activateur transcriptionnel. Par ailleurs, il peut comprendre plusieurs domaines d'un même type. Un exemple adéquate est constitué par l'hétérodimère développé par Rivera et al. (1996, Nat. Med. 2, 1028-1032) activé par la liaison de la rapamycine aux portions FKBP12 et FRAP.

Le terme «domaine de liaison au ligand» fait référence à la portion de l'activateur transcriptionnel qui interagit avec un ligand-inducteur approprié. L'interaction DLL-inducteur place l'activateur transcriptionnel en état activé, étape nécessaire à l'activation transcriptionnelle. Le DLL est de préférence localisé à l'extrémité C-terminale du ou d'un polypeptide composant ledit activateur transcriptionnel.

Le terme «domaine de liaison à l'ADN» fait référence à la portion de l'activateur transcriptionnel qui interagit avec la séquence d'ADN cible présente au sein du promoteur inductible contrôlant l'expression du gène d'intérêt et spécifique de l'activateur transcriptionnel choisi. Ladite séquence cible est généralement placée en amont d'une région promotrice contenant au moins une TATA box et est composée de motifs reconnus par l'activateur transcriptionnel. Ces motifs peuvent former une structure particulière (palindrome, répétitions en orientation sens ou inversée ...etc). Les séquences cibles adaptées à chaque activateur transcriptionnel sont décrites dans la littérature. Pour illustrer, on peut citer :

- la séquence cible GRE (pour glucocorticoïd responsive element) comportant un motif TGTCT (ou son complémentaire) reconnu par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur GR ou d'un

analogue (GR^{dex}). Un exemple préféré est constitué par la séquence 5'GGTACANNNTGTTCT3' où N représente un nucléotide quelconque ;

- 5 - la séquence cible ERE (pour oestrogen responsive element) comportant un motif 5'AGGTCA3' (ou son complémentaire) reconnu par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur ER ou d'un analogue (ER^T). Un exemple préféré est constitué par la séquence 5'AGGTCANNNTGACC3' où N représente un nucléotide quelconque ;
- 10 - la séquence cible UAS (pour upstream activating sequence) de séquence 5' CGGAGTACTGTCCTCCG3' (ou son complémentaire) reconnue par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur Gal 4 de levure ou d'un analogue ;
- 15 - la séquence cible EcRE (pour ecdysone responsive element) comportant un motif GACAAG (ou son complémentaire) reconnu par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur EcR ou d'un analogue. Un exemple préféré est constitué par la séquence 5'GACAAGGGTTCAATGCACTTGTC3' ;
- 20 - la séquence 5xE/GRE de séquence 5'AGGTCANAGAACA3' (ou son complémentaire) reconnue par un domaine de liaison à l'ADN hybride entre EcR et GR ou d'un analogue,
- la séquence cible 5' TAATTANGGGNG3' où N représente un nucléotide quelconque, reconnue par le facteur de transcription ZFHD1
- 25 - la séquence cible XRE (pour xenobiotique responsive element) de séquence 5'CCTCCAGGCTTCTTCTCAGCAACTCC3' reconnue par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur AhR ou d'un analogue.

Le terme «domaine de trans-activation» fait référence à la portion de l'activateur transcriptionnel qui interagit avec la machinerie cellulaire pour initier ou stimuler la transcription génique dépendante de la séquence cible répondant audit activateur. Ce domaine peut être issu d'un facteur de transcription classique (NF κ B, SP-1...) ou d'un facteur ligand-dépendant (récepteur stéroïdien, immunophiline, AhR...). Un domaine comprenant les 130 acides aminés C-terminaux de VP16 convient tout particulièrement.

La trans-activation induite par l'activateur transcriptionnel en usage dans le cadre de la présente invention peut être vérifiée simplement par des techniques conventionnelles, par exemple en suivant l'expression d'un gène donné placé sous le contrôle de la séquence cible adéquate ou la synthèse de son produit d'expression (analyse selon Northern, Western, immunofluorescence...etc) en présence du récepteur activé par l'inducteur. Un protocole détaillé est donné dans les exemples ci-après. Une différence d'un facteur d'au moins 2, avantageusement d'au moins 5 et, de préférence, d'au moins 10 reflète la capacité de trans-activation du système d'expression selon l'invention.

On peut illustrer ces définitions par l'exemple du récepteur GR. Son domaine de trans-activation est localisé dans la partie N-terminale entre les résidus 272 et 400 (Jonat et al., 1990, Cell 62, 1189-1204), le domaine de liaison à l'ADN de 66 acides aminés entre les résidus 421 et 487 (Lucibello et al., 1990, EMBO J. 9, 2827-2834) et le domaine de liaison au ligand hormonal d'environ 300 acides aminés dans la partie C-terminale (Kerpolla et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13, 3782-3791). Ce dernier domaine comprend également les séquences responsables pour la dimérisation du GR, sa localisation nucléaire et l'interaction avec les protéines hsp. La trans-activation est médiée par la liaison d'un dimère de récepteur à la séquence cible GRE.

Avantageusement, l'activateur transcriptionnel inclu dans le système d'expression inductible selon l'invention comporte tout ou partie d'un domaine dérivé d'un récepteur d'hormones stéroïdes choisi parmi le groupe constitué par

les récepteurs oestrogène (ER), glucocorticoïde (GR), progestérone (PR), Vitamine D, ecdysone (EcR), minéralocorticoïde, androgène, hormone thyroïde, acide rétinoïque et acide rétinoïque X ou encore d'une immunophiline ou d'un récepteur aryl hydrocarbon (AhR).

5 Dans le cadre de la présente invention, on peut mettre en oeuvre un récepteur modifié. Avantageusement, le récepteur modifié a perdu sa capacité d'activation par un inducteur naturel et acquis une capacité d'activation par un inducteur non naturel et retient la capacité de trans-activation du récepteur natif. L'homme de l'art connaît la ou les modifications à effectuer à cet égard. Elles
10 peuvent être diverses (délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs résidus du récepteur naturel) et concerner un ou plusieurs domaines. De manière préférée, le domaine fonctionnel modifié présente une identité de séquence avec son équivalent natif d'au moins 70 %, avantageusement d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 % et, de manière tout à fait préférée d'au moins 95%.

15 Selon un premier mode de réalisation, on a recours à un récepteur modifié dans son DLL de manière à être activable par un inducteur non naturel. Des exemples préférés sont constitués par les mutants GR^{dcx} (I747T) et ER^T (G521R) déjà cités.

On peut également envisager de mettre en oeuvre un activateur
20 transcriptionnel chimère comprenant des polypeptides ou fragments polypeptidiques variés. Avantageusement, il résulte de la fusion ou de l'association de domaines fonctionnels d'origines différentes. En effet, il est possible d'échanger les domaines fonctionnels entre les différents récepteurs et toutes les combinaisons possibles entrent dans le cadre de la présente invention. Par exemple, pour réduire
25 l'interférence avec les complexes récepteurs / ligands endogènes, on peut envisager de remplacer le domaine de liaison à l'ADN d'un récepteur stéroïdien par celui d'un récepteur non humain (d'origine virale ou animale ou d'eucaryote inférieur), par exemple un récepteur stéroïdien animal, un récepteur de levure (Gal4)... la

seule condition étant d'adapter la séquence cible au domaine de liaison à l'ADN retenu. Une telle adaptation est à la portée de l'homme de l'art. A titre indicatif, lorsque le domaine de liaison à l'ADN est issu de Gal4, le promoteur inductible mis en oeuvre contiendra les éléments UAS (Upstream Activating Sequences) répondant à Gal4. Par ailleurs, le domaine de trans-activation peut être issu de n'importe quel domaine d'activation transcriptionnel connu, notamment de la protéine 16 du virus herpès simplex (VP16) ou de la p65 du facteur NFkB et en particulier, de son extrémité C-terminale. Un activateur transcriptionnel associant un DLL dérivé d'un récepteur stéroïdien, un domaine de trans-activation dérivé de VP16 et un domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ou d'un récepteur stéroïdien convient à la mise en oeuvre de la présente invention. A cet égard, on utilisera de préférence les résidus 1 à 74 de Gal4. Mais d'autres combinaisons sont également envisageables.

Par ailleurs, on peut employer également un domaine fonctionnel hybride entre des fragments polypeptidiques différents. Un exemple possible est constitué par un domaine de liaison à l'ADN hybride entre les récepteurs EcR et GR, reconnaissant une séquence cible hybride comportant les motifs répondant à l'ecdysone et aux glucocorticoïdes.

Un activateur transcriptionnel préféré dans le cadre de la présente invention est choisi parmi :

- (i) un polypeptide désigné GR^{dex} comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivés d'un récepteur aux glucocorticoïdes, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment par substitution de l'isoleucine en position 747 par une thréonine ;
- (ii) un polypeptide désigné ER^T comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivé d'un récepteur à l'oestrogène, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment par substitution de la glycine en position 521 par une arginine ;

- (iii) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un DLL dérivé du récepteur à l'ecdysone, un domaine de liaison à l'ADN hybride dérivé de ceux des récepteurs EcR et GR et un domaine de trans-activation dérivé de la protéine virale VP16 et un second polypeptide dérivé de la protéine USP de drosophile ou d'un homologue tel que le récepteur de l'acide rétinoïque X (RXR) humain ;
- (iv) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un domaine de liaison à l'ADN dérivé du facteur de transcription ZFHD1 et un DLL dérivé de l'immunophiline FKBP12 et un second polypeptide comportant un domaine de trans-activation dérivé du facteur NFκB p65 et un DLL dérivé de FRAP (FKBP12-rapamycine-associated protein) ; et
- (v) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide dérivé du récepteur AhR et un deuxième polypeptide dérivé de la protéine Arnt.
- De préférence, les activateurs transcriptionnels (i) et (ii) sont sous forme d'homodimères et (iii) (iv) et (v) sont sous forme d'hétérodimères associant le premier et le second polypeptide et, éventuellement, l'inducteur.

Selon un mode de réalisation tout à fait avantageux, l'activateur transcriptionnel est activé par liaison à un inducteur non naturel et n'est pas ou peu activé par un composé humain naturel.

Le terme «inducteur non naturel» se réfère à un composé qui n'est pas trouvé naturellement dans l'organisme humain ou animal à qui la thérapie utilisant le système d'expression inductible selon l'invention est destinée. Il s'agit de préférence d'un inducteur synthétique qui n'est pas trouvé naturellement dans un organisme humain et dont la structure est légèrement différente de celle d'un composé humain (endogène). Aux fins de la présente invention, un inducteur non naturel est capable d'activer l'activateur transcriptionnel en usage dans le cadre de la présente invention, en particulier par liaison au DLL, afin d'initier ou stimuler la transcription dépendante de la séquence cible répondant audit activateur. Le

choix d'un inducteur non naturel adapté à l'activateur transcriptionnel retenu est à la portée de l'homme de l'art sur la base de l'état de la technique. L'activation de l'activateur transcriptionnel par l'inducteur non naturel peut se faire par une interaction covalente ou non covalente (électrostatique, hydrophobe, liaison hydrogène ... etc). Par ailleurs, l'inducteur peut être constitué par un composé unique ou par un ensemble de molécules. Il appartient de préférence à la famille des stéroïdes, rétinoides, acides gras, vitamines, hormones, xénobiotiques ou antibiotiques.

Selon un mode de réalisation avantageux, ledit inducteur non naturel est une substance synthétique administrable par voie orale. De préférence, il est choisi parmi le groupe constitué par la dexaméthasone, le tamoxifène, le muristérone A, l'ecdysone, la rapamycine et le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) ou un analogue quelconque de ces composés, de préférence peu ou pas toxique.

Les séquences codant pour l'activateur transcriptionnel compris dans le système d'expression inductible selon l'invention sont placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés permettant l'expression dans une cellule ou un organisme hôte. Le terme «éléments de régulation appropriés» regroupent l'ensemble des éléments permettant la transcription desdites séquences en ARN et la traduction en protéine. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote, procaryote ou même virale. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène endogène. Par ailleurs, il peut être constitutif ou régulable. En outre, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription, rendre un promoteur constitutif régulable ou *vice versa*, introduire un site de restriction..... On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycérate Kinase), MT (metallothionine ; Mc Ivor et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848), le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus), le LTR du RSV (Rous Sarcoma Virus), le promoteur TK-HSV-1, le promoteur précoce du virus CMV (Cytomegalovirus)

et les promoteurs gouvernant l'expression des gènes adénoviraux tardifs (MLP) et précoces (E1A, E2A, E3 ou E4). Mais, il peut également être intéressant de réguler l'expression de l'activateur transcriptionnel. Selon une première variante, son expression peut être contrôlée par sa séquence cible spécifique (autoactivation et/ou activation par le récepteur sauvage endogène activé par le ligand endogène). Par exemple, on aura recours aux éléments ERE ou GRE pour l'expression d'un activateur transcriptionnel comportant un domaine de liaison à l'ADN dérivé de ER ou GR (ER^T ou GR^{del}). Une autre possibilité est l'emploi d'un promoteur régula-
5 ble choisi parmi ceux de l'art antérieur. A cet égard, l'utilisation d'un promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse peut être
10 avantageuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin. Invest. 96, 2775-2782), CEA (pour carcinoma embryonic antigen) surexprimé dans les cancers du colon (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748),
15 tyrosinase surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993, Cancer Res. 53, 3860-3864), ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175) et α -fétoprotéine surexprimée dans les cancers du foie (Kanai et al., 1997, Cancer Res. 57, 461-465). On indique que le promoteur précoce du Cytomégalo-virus (CMV) est tout particulièrement préféré.

20 Bien entendu, les éléments de régulation appropriés peuvent en outre comprendre des éléments additionnels améliorant l'expression (séquence intronique, séquence terminatrice de la transcription...) ou encore le maintien dans une cellule hôte. De tels éléments sont connus de l'homme de l'art.

Lorsque l'activateur transcriptionnel en usage dans le cadre de la présente
25 invention est composé par un ensemble de polypeptides, ceux-ci peuvent être produits à partir de séquences nucléotidiques polycistroniques (placées sous le contrôle d'un promoteur unique) mettant en oeuvre un site d'initiation de la traduction de type IRES pour initier la traduction du second cistron. On peut également employer un promoteur bidirectionnel dirigeant l'expression de deux

gènes placés de part et d'autre. On peut aussi générer des cassettes d'expression indépendantes comportant chacune des éléments de régulation appropriés tels que ceux cités auparavant. Les cassettes peuvent être portées par un même vecteur d'expression ou par des vecteurs différents.

- 5 Les séquences employées dans le cadre de la présente invention peuvent être obtenues par les techniques classiques de biologie moléculaire, par exemple par criblage de banque à l'aide de sondes spécifiques, par immunocriblage de banque d'expression, par PCR au moyen d'amorces adéquates ou par synthèse chimique. Les mutants peuvent être générés à partir des séquences natives par
10 substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides en mettant en oeuvre les techniques de mutagenèse dirigée, de PCR, de digestion par les enzymes de restriction et ligation ou encore par synthèse chimique. La fonctionnalité des mutants et des constructions peut être vérifiée par les techniques de l'art.

- La deuxième composante du système d'expression inductible selon
15 l'invention est un vecteur adénoviral recombinant comportant au moins un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

- On aura de préférence recours à un vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie d'au moins une région essentielle à la réplication sélectionnée parmi les
20 régions E1, E2, E4 et L1 à L5, afin d'éviter sa propagation au sein de l'organisme hôte ou de l'environnement. Une délétion de la majorité de la région E1 est préférée. Avantageusement, elle s'étend des nt 454 à 3328 mais peut également englober des séquences additionnelles en 5' et 3' à la condition de ne pas interférer avec la fonction d'encapsidation. De préférence, le gène pIX n'est pas inclus dans
25 la délétion de E1. En outre, elle peut être combinée à d'autres modification(s) touchant notamment les régions E2, E4 et/ou L1-L5, dans la mesure où les fonctions essentielles déficientes sont complétées *en trans* au moyen d'une lignée de complémentation et/ou d'un virus auxiliaire. A cet égard, on peut avoir recours aux vecteurs de seconde génération défectifs pour les fonctions E1 et E4

ou E1 et E2 (voir par exemple les demandes internationales WO94/28152 et WO97/04119). Pour illustrer ce mode de réalisation, on peut citer un vecteur combinant une délétion au sein de la région E1 et une mutation thermosensible affectant le gène DBP (pour DNA Binding Protein en anglais) de la région E2A (Ensinger et al., 1972, *J. Virol.* *10*, 328-339). Pour ce qui est de la région E4, elle peut être délétée en totalité ou en partie. Une délétion partielle de la région E4 à l'exception des séquences codant pour les cadres de lecture ouverts (ORF) 3 et/ou 6/7 est avantageuse dans la mesure où elle ne nécessite pas de complémentation de la fonction E4 (Ketner et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* *17*, 3037-3048). Dans le but d'augmenter les capacités de clonage, le vecteur adénoviral recombinant peut en outre être dépourvu de tout ou partie de la région E3 non essentielle. Selon cette alternative, il peut être intéressant de conserver néanmoins les séquences E3 codant pour les polypeptides permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte, notamment la glycoprotéine gp19k (Gooding et al., 1990, *Critical Review of Immunology* *10*, 53-71). Selon une autre alternative, on peut employer un vecteur adénoviral minimal retenant essentiellement les ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' et 3' et la région d'encapsidation et défectif pour l'ensemble des fonctions virales.

Par ailleurs, l'origine du vecteur adénoviral du système d'expression inductible selon l'invention, peut être variée aussi bien du point de vue de l'espèce que du sérotype. Il peut dériver du génome d'un adénovirus humain ou animal (canin, aviaire, bovin, murin, ovin, porcin, simien...) ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral d'au moins deux origines différentes. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., *Arch. Virol.*, 1993, *128*: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, *J. Gen. Virol.*, 1989, *70*: 165-172 ; Jouvenne et al., *Gene*, 1987, *60*: 21-28 ; Mittal et al., *J. Gen. Virol.*, 1995, *76*: 93-102). Cependant, on préférera un vecteur adénoviral d'origine humaine dérivant de préférence d'un adénovirus de sérotype C,

notamment de type 2 ou 5.

Le gène d'intérêt en usage dans la présente invention, peut être issu d'un organisme eucaryote, d'un procaryote d'un parasite ou d'un virus autre qu'un adénovirus. Il peut être isolé par toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art, par exemple par clonage, PCR ou synthèse chimique. Il peut être de type
5 génomique (comportant tout ou partie de l'ensemble des introns), de type ADN complémentaire (ADNc, dépourvu d'intron) ou de type mixte (minigène). Par ailleurs, il peut coder pour un ARN antisens et/ou un ARN messenger (ARNm) qui sera ensuite traduit en polypeptide d'intérêt celui-ci pouvant être (i) intracellulaire,
10 (ii) incorporé dans la membrane de la cellule hôte ou (iii) sécrété. Il peut s'agir d'un polypeptide tel que trouvé dans la nature (natif), d'une portion de celui-ci (tronqué), d'un mutant présentant notamment des propriétés biologiques améliorées ou modifiées ou encore d'un polypeptide chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses. Par ailleurs, le gène d'intérêt peut coder pour un
15 ARN anti-sens, un ribozyme, ou encore un polypeptide d'intérêt.

Parmi les polypeptides d'intérêt utilisables, on peut citer plus particulièrement les chémokines et cytokines (interféron α , β ou γ , interleukine (IL), notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou encore l'IL-12, facteur nécrosant des tumeurs (TNF), facteur stimulateur de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...),
20 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, protéine de chémoattraction des monocytes telle que MCP-1...), les récepteurs cellulaires (notamment reconnus par le virus HIV), les ligands de récepteur, les facteurs de coagulation (Facteur VIII, Facteur IX, thrombine, protéine C), les facteurs de croissance (FGF pour Fibroblast Growth Factor, VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor), les enzymes (uréase,
25 rénine, métalloprotéinase, nitric oxide synthétase NOS, SOD, catalase, lécithine cholestérol acyl transférase LCAT...), les inhibiteurs d'enzyme (α 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteur de protéase virale, PAI-1 pour plasminogen activator inhibitor), les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II

- ou polypeptides agissant sur l'expression des gènes correspondants, les polypeptides capables d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement, les polypeptides agissant positivement ou négativement sur l'apoptose (Bax, Bcl2, BclX...), les agents cytostatiques (p21, p 16, Rb), les
- 5 immunoglobulines en totalité ou en partie (Fab, ScFv...), les toxines, les immunotoxines, les apolipoprotéines (ApoA1, ApoAIV, ApoE...), les inhibiteurs d'angiogénèse (angiostatine, endostatine...), les marqueurs (β -galactosidase, luciférase....) ou tout autre polypeptide ayant un effet thérapeutique pour l'affection ciblée.
- 10 Plus précisément, dans le but de traiter un dysfonctionnement héréditaire, on utilisera une copie fonctionnelle du gène défectueux, par exemple un gène codant pour le facteur VIII ou IX dans le cadre de l'hémophilie A ou B, la dystrophine (ou minidystrophine) dans le cadre des myopathies de Duchenne et Becker, l'insuline dans le cadre du diabète, la protéine CFTR (Cystic Fibrosis
- 15 Transmembrane Conductance Regulator) dans le cadre de la mucoviscidose. S'agissant d'inhiber l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers, on mettra de préférence en oeuvre un gène d'intérêt codant pour un ARN anti-sens, un ribozyme, un produit cytotoxique (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique, produit des gènes de levure
- 20 *FCY1* et *FUR1* codant pour l'uracyle phosphoribosyl transférase et la cytosine désaminase.....), une immunoglobuline, un inhibiteur de la division cellulaire ou des signaux de transduction, un produit d'expression d'un gène suppresseur de tumeur (p53, Rb, p73, DCC....), un polypeptide stimulateur du système immunitaire, un antigène associé à une tumeur (MUC-1, BRCA-1, antigènes précoces ou tardifs
- 25 (E6, E7, L1, L2...) d'un virus à papillome HPV....), éventuellement en combinaison avec un gène de cytokine. Enfin, dans le cadre d'une thérapie anti-HIV, on peut avoir recours à un gène codant pour un polypeptide immunoprotecteur, un épitope antigénique, un anticorps (2F5; Buchacher et al., 1992, Vaccines 92, 191-195), le domaine extracellulaire du récepteur CD4 (sCD4 ; Trauneker et al., 1988, Nature

33/, 84-86) une immunoadhésine (par exemple un hybride CD4-immunoglobuline IgG ; Capon et al., 1989, Nature 337, 525-531 ; Byrn et al., 1990, Nature 344, 667-670), une immunotoxine (par exemple fusion de l'anticorps 2F5 ou de l'immunoadhésine CD4-2F5 à l'angiogénine ; Kurachi et al., 1985, Biochemistry 24, 5494-5499), un variant trans-dominant (EP 0614980, WO95/16780), un produit
5 cytotoxique tel que l'un de ceux mentionné ci-dessus ou encore un IFN α ou β .

Un des gènes d'intérêt peut également être un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées ou transduites. On peut citer les gènes *neo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une
10 résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transférase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase). D'une manière générale, les gènes de sélection sont connus de l'homme de l'art.

Par ailleurs, la cassette d'expression du gène d'intérêt peut, en outre,
15 inclure des éléments additionnels améliorant son expression ou son maintien dans la cellule hôte (origines de réplication, éléments d'intégration dans le génome cellulaire, séquences introniques, séquences poly A de terminaison de la transcription, leaders tripartites...). Ces éléments sont connus de l'homme de l'art. En outre, le gène d'intérêt peut également comporter en amont de la région
20 codante une séquence codant pour un peptide signal permettant sa sécrétion de la cellule hôte. Le peptide signal peut être celui du gène en question ou hétérologue (issu d'un gène quelconque sécrété ou synthétique).

La cassette d'expression du gène d'intérêt peut être insérée à un endroit quelconque du génome adénoviral. Avantagusement, elle est introduite en
25 remplacement de la région E3. Lorsque le vecteur adénoviral recombinant comporte plusieurs gènes d'intérêt, ceux-ci peuvent être placés sous le contrôle des mêmes éléments génétiques (cassette polycistronique utilisant un site interne d'initiation de la traduction de type IRES pour réinitier la traduction du second cistron) ou d'éléments indépendants. Dans ce cas, ils peuvent être insérés dans une

même région adénovirale (par exemple en remplacement de E3) ou dans des régions différentes (par exemple en remplacement de E3 et d'une autre région déléetée).

5 Dans le cadre de la présente invention, l'expression du gène d'intérêt est contrôlée par un promoteur inductible par un activateur transcriptionnel tel que défini ci-avant. Au sens de la présente invention, un promoteur inductible comprend au moins une séquence cible répondant à l'activateur transcriptionnel mis en oeuvre et associée de manière opérationnelle à un promoteur minimal. Les séquences cibles ont été définies auparavant et sont décrites dans la littérature accessible à l'homme de l'art (pour rappel, ERE, GRE, EcRE, UAS, 5xE/GRE, XRE...). On indique que l'on peut employer une séquence homologue modifiée par rapport à la séquence native mais exerçant une fonction de régulation similaire ou améliorée. Ces modifications peuvent résulter de l'addition, de la délétion et/ou de la substitution d'un ou plusieurs nucléotides ou de fusion entre deux séquences cibles différentes. On peut mettre en oeuvre une ou plusieurs séquences cibles, par exemple de 1 à 25, avantageusement de 1 à 10 et, de préférence, de 1 à 7, éventuellement placées en tandem et dans une orientation quelconque par rapport à la TATA box. Elle(s) est (sont) généralement insérée(s) dans le promoteur inductible en amont du promoteur minimal, jusqu'à plusieurs centaines de paires de bases de celui-ci. Un exemple de promoteur inductible par un activateur transcriptionnel dérivé du GR, est le LTR du virus MMTV (mouse mammary tumor virus) qui contient l'élément GRE et des séquences promotrices adéquates.

15 Un promoteur minimal comprend essentiellement une TATA box et un site d'initiation de la transcription fonctionnels dans une cellule ou un organisme hôte. Ces éléments sont classiques dans le domaine de l'art concerné. On peut citer plus particulièrement les promoteurs minimaux des gènes TK, CMV et HSP (promoteur minimal du gène de protéine de choc thermique de drosophile dépourvu de l'enhancer).

En outre, le promoteur inductible en usage dans le cadre de la présente

invention peut comporter des éléments supplémentaires améliorant le niveau de transcription ou le limitant à certains tissus particuliers (de type enhancer). Ces éléments supplémentaires peuvent de manière alternative être insérés dans une région génique non codante.

- 5 Selon un premier mode de réalisation, les séquences nucléotidiques codant pour l'activateur transcriptionnel et leurs éléments de régulation sont portées par le vecteur adénoviral recombinant du système d'expression selon l'invention. Les cassettes d'expression du gène d'intérêt et de l'activateur transcriptionnel peuvent être localisées dans la même région du génome adénoviral ou en des endroits
10 différents et en orientation sens ou anti-sens l'une par rapport à l'autre. L'orientation anti-sens est préférée. Un exemple préféré est fourni par un vecteur E1⁻ E3⁻ dans lequel chacune des cassettes est insérée à la place des séquences adénovirales délétées.

- Selon une autre variante, les séquences nucléotidiques sont portées par un
15 vecteur d'expression indépendant autre que le vecteur adénoviral recombinant en usage dans le système d'expression selon l'invention. Il peut s'agir d'un vecteur synthétique (lipides cationiques, liposomes polymères ...), d'un plasmide ou encore d'un vecteur viral. Il peut être éventuellement associé à une ou plusieurs substances améliorant l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité du vecteur. Ces substances
20 sont largement documentées dans la littérature accessible à l'homme de l'art (voir par exemple Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman , 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342 ; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). A titre illustratif mais non limitatif, il peut s'agir de polymères, de lipides notamment cationiques, de liposomes, de
25 protéines nucléaires ou encore de lipides neutres. Ces substances peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Une combinaison envisageable est un vecteur recombinant plasmidique associé à des lipides cationiques (DOGS, DC-CHOL, spermine-chol, spermidine-chol etc...) et des lipides neutres (DOPE).

 Le choix des plasmides utilisables dans le cadre de la présente invention est

vaste. Il peut s'agir de vecteurs de clonage et/ou d'expression. D'une manière générale, ils sont connus de l'homme de l'art et nombre d'entre eux sont disponibles commercialement mais il est également possible de les construire ou les modifier par les techniques de manipulation génétique. On peut citer à titre
5 d'exemples les plasmides dérivés de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagène), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) ou encore p Poly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201). De préférence, un plasmide mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention contient une origine de replication assurant l'initiation de la replication dans une cellule productrice et/ou une cellule hôte (par
10 exemple, on retiendra l'origine ColE1 pour un plasmide destiné à être produit dans *E. coli* et le système oriP/EBNA1 si l'on désire qu'il soit autoreplicatif dans une cellule hôte mammifère, Lupton et Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542 ; Yates et al., Nature 313, 812-815). Il peut en outre comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées
15 (complémentation d'une mutation d'auxotrophie, gène codant pour la résistance à un antibiotique...). Bien entendu, il peut comprendre des éléments supplémentaires améliorant son maintien et/ou sa stabilité dans une cellule donnée (séquence *cer* qui favorise le maintien monomérique d'un plasmide (Summers et Sherratt, 1984, Cell 36, 1097-1103, séquences d'intégration dans le génome cellulaire).

20 S'agissant d'un vecteur viral, on peut envisager un vecteur dérivant d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus associé à l'adénovirus (AAV), d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus, d'un parvovirus, d'un poxvirus (fowlpox, canaripox, virus de la vaccine notamment de la souche MVA (Modified Virus Ankara) ou Copenhagen... etc) ou d'un foamyvirus. On aura de préférence recours à un
25 vecteur non réplcatif et, éventuellement, non intégratif.

Les rétrovirus ont la propriété d'infecter et de s'intégrer majoritairement dans les cellules en division et à cet égard sont particulièrement appropriés pour l'application cancer. Un vecteur rétroviral convenant à la mise en oeuvre de la présente invention comporte les séquences terminales LTR, une région

d'encapsidation et les séquences nucléotidiques codant pour l'activateur transcriptionnel dont l'expression est contrôlée par le promoteur rétroviral (dans le LTR 5') ou par un promoteur interne tel que cité ci-dessus. Il peut dériver d'un rétrovirus d'une origine quelconque (murin, primate, félin, humain etc...) et en particulier du MoMuLV (Moloney murine leukemia virus), MVS (Murine sarcoma virus) ou Friend murine retrovirus (Fb29). Il est propagé dans une lignée d'encapsidation capable de fournir *en trans* les polypeptides viraux gag, pol et/ou env nécessaires à la constitution d'une particule virale. De telles lignées sont décrites dans la littérature (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc...). Le vecteur rétroviral selon l'invention peut comporter des modifications notamment au niveau des LTRs (remplacement de la région promotrice par un promoteur eucaryote) ou de la région d'encapsidation (remplacement par une région d'encapsidation hétérologue, par exemple de type VL30) (voir les demandes françaises 94 08300 et 97 05203).

Un vecteur adénoviral convient tout particulièrement pour l'expression de l'activateur transcriptionnel envisagé dans le cadre de la présente invention. On aura de préférence recours à un vecteur déficient ayant l'une des caractéristiques précitées. En particulier, les vecteurs adénoviraux recombinant (portant la cassette d'expression inductible du gène d'intérêt) et indépendant (portant la cassette d'expression de l'activateur transcriptionnel) sont de préférence tous deux déficients pour la fonction E1 par délétion de tout ou partie de la région E1 ou mutation non fonctionnelle. Le cas échéant, l'un ou l'autre ou les deux peuvent être en outre déficient(s) pour au moins l'une des fonctions E2, E4, L1, L2, L3, L4 et/ou L5. De même, une délétion de tout ou partie de la région E3 peut être envisagée pour l'un ou les deux vecteurs.

Selon un mode de réalisation avantageux, les vecteurs viraux (vecteur adénoviral recombinant et, le cas échéant, ledit vecteur viral indépendant) faisant partie du système d'expression selon l'invention peuvent être sous la forme de vecteur ADN ou de particule virale infectieuse.

La présente invention concerne également un vecteur adénoviral recombinant comprenant

- 5 (i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte, et
- (ii) un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

Le vecteur adénoviral recombinant selon l'invention peut coder pour un activateur transcriptionnel ayant les caractéristiques définies auparavant qui, sous

10 forme activé par un inducteur tel que décrit précédemment, a la capacité d'initier ou d'activer la transcription d'un gène contrôlé par un promoteur inductible comprenant une séquence cible spécifique dudit activateur transcriptionnel telle que décrite ci-dessus.

De manière alternative, le vecteur adénoviral recombinant selon l'invention

15 peut coder pour un activateur transcriptionnel procaryotique et, notamment, un polypeptide comprenant un DLL et un domaine de liaison à l'ADN dérivé d'un répresseur de l'opéron tétracycline (tetR) et un domaine d'activation de la transcription quelconque. Il s'agit de préférence du polypeptide désigné dans la littérature «trans-activateur tétracycline» tTA (Gossen et Bujard, 1992, Proc. Natl.

20 Acad. Sci. USA 89, 5547-551) dans lequel le tetR isolé du transposon Tn10 est fusionné en phase aux 130 acides aminés C-terminaux de la protéine virale VP16. Dans ce cas, on mettra en oeuvre un inducteur non naturel activant le tTA, tel que la doxycycline, la tétracycline ou un analogue agoniste. Bien entendu, les caractéristiques de la cassette d'expression inductible du gène d'intérêt sont les

25 mêmes que précédemment, mis à part la présence d'une ou plusieurs séquence(s) cible(s) répondant à l'activateur transcriptionnel procaryotique. S'agissant de tTA, la séquence cible est constituée par l'opérateur tétracycline (tetO). Dans le cadre de la présente invention, on préfère tout particulièrement la combinaison "tet O - promoteur minimal" donnant lieu à un promoteur dont le niveau de base de la

transcription est naturellement très faible mais activable par l'inducteur tTA et répressible par la tétracycline.

Il n'est pas nécessaire de revenir sur le squelette du vecteur adénoviral recombinant selon l'invention dans la mesure où il répond aux caractéristiques déjà
5 mentionnées.

La présente invention concerne également une particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention.

Les techniques de préparation des vecteurs adénoviraux sont largement documentées dans la littérature. Dans un premier temps, le génome est reconstitué
10 par recombinaison homologue dans la lignée 293 (voir notamment Graham et Preveet, 1991, Methods in Molecular Biology, Vol 7, Gene Transfer and Expression Protocols ; Ed E. J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ) ou dans *Escherichia coli* (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810 ; WO96/17070). Il est ensuite nécessaire de propager le vecteur afin de constituer
15 un stock de particules virales le contenant. On utilise à cet effet des lignées de complémentation fournissant *en trans* les produits d'expression viraux pour lesquels le vecteur est defectif. Par exemple, les virus délétés de E1 peuvent être propagés dans la lignée 293, établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). Pour ce qui est des
20 vecteurs de seconde génération, on peut avoir recours à des lignées complémentant deux fonctions virales essentielles, telles que celles décrites par Yeh et al. (1996, J. Virol. 70, 559-565), Krougliak et Graham (1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586), Wang et al. (1995 Gene Therapy 2, 775-783), Lusky et al. (1998, J. Virol. 72, 2022-2033) et dans les demandes internationales WO94/28152 et
25 WO97/04119. Une autre alternative repose sur l'emploi d'un élément viral supplémentaire, désigné "virus auxiliaire" pour compléter au moins en partie les fonctions défectives d'un vecteur adénoviral recombinant. Les virus auxiliaires de l'art antérieur consistent en un génome adénoviral, éventuellement délété d'une région essentielle pour laquelle le vecteur recombinant ne nécessite pas de

complémentation.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule virale, selon lequel :

- 5 (i) on introduit un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule de complémentation transfectée,
- 10 (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et
- (iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

Bien entendu, la particule virale peut être récupérée du surnageant de culture mais également des cellules. Une des méthodes couramment employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un gradient de chlorure de césium...).

La présente invention concerne également une cellule eucaryote comprenant un système d'expression inductible, un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention ou infectée par une particule virale selon l'invention. Aux fins de la présente invention, une telle cellule est constituée par toute cellule transfectable par un vecteur ou infectable par une particule virale, tels que définis ci-avant. Une cellule de mammifère et notamment humaine convient tout particulièrement. Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine quelconque, notamment hématoopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage...), musculaire (cellule satellite, myocyte, myoblaste, muscle lisse...), cardiaque, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique un système d'expression inductible, un vecteur adénoviral

recombinant, une particule virale ou une cellule hôte selon l'invention en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Une composition selon l'invention est plus particulièrement destinée au traitement préventif ou curatif de maladies par thérapie génique (y compris immunothérapie) et s'adresse plus particulièrement aux maladies prolifératives (cancers, tumeurs, dysplasies...etc), aux maladies infectieuses et notamment virales (induites par les virus de l'hépatite B ou C, le HIV, l'herpès, les rétrovirus....etc), aux maladies génétiques (mucoviscidose, myopathies, hémophilie, diabète...) et aux maladies cardiovasculaires (resténose, ischémie, dislipidémie...).

10 Une composition selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle en vue d'une administration par voie locale, parentérale ou digestive. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Les voies d'administration envisageables sont multiples. On peut
15 citer par exemple la voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intraartérielle, intrapéritonéale, intratumorale, intranasale, intrapulmonaire ou intratrachéale. Pour ces trois derniers modes de réalisation, une administration par aérosol ou instillation est avantageuse. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois
20 après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et les doses de virus appropriées varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu, de la pathologie, du gène d'intérêt à transférer, de la voie d'administration. A titre indicatif, les préparations à base de particules virales peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} ufp (unités formant des plaques),
25 avantageusement 10^3 et 10^{13} ufp et, de préférence, 10^6 et 10^{12} ufp. Lorsque l'on met en oeuvre un ou des vecteur(s), des doses comprenant de 0,01 à 100 mg d'ADN, de préférence 0,05 à 10 mg et, de manière tout à fait préférée, 0,5 à 5 mg peuvent être envisagées.

La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même que des agents de solubilisation, de stabilisation, de préservation. Une composition préférée est sous forme injectable. Elle peut être formulée en solution aqueuse, saline (phosphate, monosodique, disodique, magnésium, potassium....) ou isotonique. Elle peut être présentée en dose unique ou en multidose sous forme liquide ou sèche (poudre, lyophilisat...) susceptible d'être reconstituée de manière extemporanée par un diluant approprié.

La présente invention est également relative à l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un système d'expression inductible, d'un vecteur adénoviral recombinant, d'une particule virale ou d'une cellule hôte selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au transfert et à l'expression dudit gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte et, en particulier, au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol, dans le système vasculaire au moyen d'une sonde appropriée...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient après une étape d'amplification éventuelle. La prévention et le traitement de nombreuses pathologies peuvent être envisagés. Une utilisation préférée consiste à traiter ou prévenir les cancers, tumeurs et maladies résultant d'une prolifération cellulaire non désirée. Parmi les applications envisageables, on peut citer les cancers du sein, de l'utérus (notamment ceux induits par les papillomas virus), de la prostate, du poumon, de la vessie, du foie, du colon, du pancréas, de l'estomac, de l'oesophage, du larynx du système nerveux central et du sang (lymphomes, leucémie etc...). Elle est également utile dans le cadre des maladies cardiovasculaires, par exemple pour inhiber ou retarder la

prolifération des cellules de muscles lisses de la paroi vasculaire (resténose). Enfin pour ce qui est des maladies infectieuses, l'application au SIDA peut être envisagée.

L'invention s'étend également à une méthode pour le traitement des
5 maladies par thérapie génique, caractérisée en ce que l'on administre à un organisme ou à une cellule hôte ayant besoin d'un tel traitement un système d'expression inductible, un vecteur adénoviral recombinant, une particule virale ou une cellule hôte selon l'invention.

Enfin, l'invention concerne également un activateur transcriptionnel
10 comprenant un DLL et un domaine de trans-activation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, notamment dérivé de la protéine de levure Gal4. Un tel activateur transcriptionnel est obtenu en échangeant par les techniques de biologie moléculaire le domaine de liaison à l'ADN du récepteur stéroïdien par celui de Gal4 (en particulier porté par les résidus 1 à 74).
15 Un hybride ER^T ou GR^{dex} et Gal4 est tout à fait préféré.

On indique que l'ensemble des dénominations utilisées dans la présente demande sont conventionnelles dans le domaine de l'art et que la portée inclut aussi les équivalents fonctionnels, c'est à dire tout polypeptide, domaine, gène, composé obtenu par modification d'un polypeptide, domaine, gène, composé natif
20 et présentant une activité de même nature, voire sensiblement augmentée.

EXEMPLES

La Figure 1 est une représentation schématique de la quantité de FIX
25 produite 144 h après transfection transitoire des cellules 293 par les plasmides pTG13064 (CMV-GR^{dex}), pTG6242 (LTR MMTV-FIX, sens) et pTG13063 (LTR MMTV-FIX, anti-sens).

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les

exemples suivants.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ou une édition plus récente) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de clonage sont réalisées dans les souches *E. coli* 5K (hsdR, mcrA), DH5 α [(recA1, endA1, hodR17 (r-m-), supE44 thi-1, gyrA (nalr)] ou NM522 (supE, thi, Δ (lac-proAB), Δ hsd5, (r-m-), (F' proAB, lacI^q, ZAM15) et celles de recombinaison homologue dans la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow, Boehringer Mannheim). Les fragments d'ADN sont purifiés à l'aide du kit de purification d'ADN GeneCleanII^R (Bio101Inc.). Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genbank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, on a recours aux lignées cellulaires 293 (Graham et al, 1977, *supra* ; disponible à l'ATCC sous la référence CRL1573), A549 E1+ (WO94/28152), A549 (ATCC CCL-185) et Vero (ATCC CCL-81). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL) complémenté avec 1 mM de glutamine, 1% d'acides aminés (Gibco BRL), 40 μ g/l de gentamycine et 10% de sérum de veau foétal (SVF, Gibco BRL). La transfection et la transduction des cellules est réalisée selon les techniques de l'art (précipitation au phosphate de calcium...)

EXEMPLE 1 : Construction d'un vecteur adénoviral co-exprimant l'activateur transcriptionnel ER^T et le gène FIX régulé par les séquences ERE.

5

L'ADNc du gène sauvage ER est contenu dans le plasmide pSG1-HEO (Tora et al., 1989, EMBO J. 8, 1981-1989). Le domaine de liaison aux oestrogènes du récepteur ER (fragment *Bam*HI-*Xba*I) est remplacé par celui du mutant ER^T (G521R) porté par le fragment *Not*I-*Xba*I de pCre-ER^T (Feil et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10887-10890). Les séquences ER^T sont insérées dans le site *Eco*RI du vecteur de transfert pTG6600. A titre indicatif, pTG6600 est un vecteur p polyII (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) dans lequel sont insérées les séquences Ad5 1 à 458, le promoteur précoce CMV, les séquences d'épissage hybrides trouvées dans le plasmide pCI (Promega Corp, comprenant le site donneur d'épissage de l'intron 1 du gène β -globine humaine et le site accepteur d'épissage du gène d'immunoglobuline de souris), les séquences de polyadénylation du virus SV40 et les séquences Ad5 3328-5788. Une telle construction est à la portée de l'homme de l'art. Le vecteur ainsi obtenu pTG6237 contient la cassette d'expression CMV-ER^T présente dans la région E1. La construction finale désignée pTG6246 est reconstituée par recombinaison homologue (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810) entre le fragment *Pac*I-*Bst*EII isolé du vecteur précédent et pTG4656 linéarisé par *Cla*I. Ce dernier est un plasmide adénoviral E1⁺ E3⁻ contenant dans E1 le gène LacZ sous le contrôle du promoteur MLP (décrit dans la demande FR97 06757). Ainsi le génome adénoviral porté par pTG6246 comprend la cassette CMV-ER^T dans la région E1 et est délété de la région E3.

L'ADNc du FIX humain (Anson et al, 1984, EMBO J. 3, 1053-1060) est cloné sous forme d'un fragment *Bam*HI isolé d'un plasmide de l'art antérieur (par

exemple décrit dans le brevet 88 14635) et inséré en aval du promoteur minimal TK-HSV précédé de la séquence ERE (Klein-Hitpass et al., 1986, Cell 46,1053-1061). La cassette est introduite dans le site *Bgl*II de pTG4664 en orientation sens et antisens (donnant respectivement pTG13227 et pTG13228). Le plasmide
5 pTG4664 comprend les nucléotides 25838 à 320004 de l'Ad5 délétes des nucléotides 27871 à 30748 de la région E3. Une recombinaison homologue avec le plasmide pTG6401 digéré par *Sfr*I (comportant le génome Ad5 déléte des régions E1 et E3) permet de générer les vecteurs adénoviraux E1' E3' portant la cassette inductible ERE/TKp-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3.
10 La construction sens (correspondant au sens de transcription de E3) est dénommée pTG13235 et la construction anti-sens pTG13236.

Les vecteurs doublement recombinants contenant les cassettes d'expression CMV-ER^T et ERE/TKp-FIX à la place des régions E1 et E3 respectivement sont
15 générés par recombinaison homologue entre les fragments portant la cassette inductible FIX isolés des vecteurs pTG13227 et pTG13228 et le vecteur pTG6246. On obtient pTG13233 et pTG13234 selon l'orientation de la cassette inductible.

**EXEMPLE 2 : Construction d'un vecteur adénoviral co-exprimant
l'activateur transcriptionnel GR^{dex} et le gène FIX régulé par
20 les séquences GRE.**

L'ADNc du récepteur GR^{dex} porté par le fragment *Eco*RI (2,7Kb) du plasmide pHG1 (Kumar et al., 1987, Cell 51, 941-951) est cloné dans le site *Eco*RI du vecteur pTG6600, pour donner pTG13064. Le vecteur adénoviral pTG13075
25 contenant la cassette d'expression CMVp-GR^{dex} en remplacement de la région E1 et déléte de la majorité de la région E3 est obtenu par recombinaison homologue entre le fragment *Pac*I-*Bst* EII isolé du vecteur précédent et pTG4656 linéarisé par *Cla*I.

Le fragment *Bam*HI contenant l'ADNc du FIX humain est inséré en aval du LTR de MMTV contenant la séquence GRE (Cato et al., 1986, EMBO J. 5, 2237-2240). La cassette est ensuite introduite en orientation sens et antisens dans le site *Bgl*II de pTG4664 bordant les séquences E3 déléetées. Les vecteurs de transfert sont désignés pTG6242 (sens) et pTG13063 (anti-sens). Une recombinaison homologue avec le plasmide pTG6401 digéré par *Sfr*I (comportant le génome adénoviral délété des régions E1 et E3) permet de générer les vecteurs adénoviraux E1⁻ E3⁻ portant la cassette inductible LTR MMTV-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3. La construction sens (identique au sens de transcription de E3) est dénommée pTG13082 et la construction anti-sens pTG13088.

Une recombinaison homologue avec le plasmide pTG13075 permet de générer les vecteurs adénoviraux E1⁻ E3⁻ portant la cassette inductible LTR MMTV-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3 et la cassette CMV-GR^{dex} dans la région E1. La construction sens (identique au sens de transcription de E3) est dénommée pTG13083 et la construction anti-sens pTG13092 (sens de transcription inverse pour les cassettes FIX et GR^{dex}).

EXEMPLE 3 : Construction d'un vecteur adénoviral co-exprimant l'activateur transcriptionnel VgEcR et le gène FIX régulé par les séquences 5x_E/GRE.

Le plasmide pVgRXR (In Vitrogen) comprend les deux sous-unités composant l'activateur transcriptionnel activable par l'ecdysone ou son analogue muristérone A. La première est composée du récepteur de l'ecdysone (VgEcR) modifié au niveau de trois acides aminés du domaine de liaison à l'ADN de façon à obtenir une séquence analogue à celle du récepteur GR et fusionné en phase au domaine de trans-activation de VP16 et la seconde du récepteur de l'acide

réinoïque humain RXR (No et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3346-3351). Les deux ADNc codant pour VgEcR et RXR dirigés par les promoteurs CMV et RSV respectivement sont modifiés par introduction d'un intron en 5' des séquences codantes (intron de pCI pour CMVp-VgEcR et intron β -globine de lapin pour RSVp-RXR) et sont introduits dans la région E1 d'un vecteur adénoviral selon la technique précédente.

Les séquences codant pour le FIX humain sont introduites en aval d'un promoteur inducible comprenant la séquence cible 5xE/GRE couplée au promoteur minimal Δ hsp (pIND ; In Vitogen). Comme précédemment, la cassette est introduite dans les deux orientations dans le site *Bgl*II de pTG4664. La recombinaison homologue avec pTG6401 digéré par *Sfr*I permet de générer les plasmides portant la cassette inducible dans la région E3 en orientation sens ou anti-sens.

On obtient le vecteur adénoviral doublement recombinant par recombinaison homologue avec le vecteur de transfert contenant les séquences VgEcR et RXR.

EXEMPLE 4 : Production des adénovirus.

Les vecteurs adénoviraux recombinants contenant les cassettes d'expression des activateurs et/ou du FIX sont libérés des plasmides correspondants (pTG13083, pTG13092, pTG13233, pTG13234...) par digestion *Pac*I avant d'être transfectés dans la lignée de complémentation 293. Le lysat cellulaire est récolté, soumis à trois étapes successives de congélation/décongélation afin de libérer les particules virales puis clarifié par centrifugation à 3500 rpm pendant 5 min. Les virions présents dans le surnageant peuvent être éventuellement amplifiés par passage sur une lignée permissive (293 ou A 549-E1+) et purifiés sur gradient de chlorure de césium selon les techniques de l'art. Le stock adénoviral est dialysé dans un tampon de formulation approprié

tel que décrit dans WO98/02522 (par exemple saccharose 1M, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1mM, Tris-HCl 10 mM et Tween 80 0,1%). Le titre viral est déterminé en unités infectieuses par dosage de la protéine DBP par immunofluorescence (Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032) ou en nombre de particules virales par mesure spectrophotométrique à 260 nm.

Un vecteur contrôle est construit en insérant l'ADNc du facteur IX humain sous le contrôle du promoteur CMV isolé du plasmide pCI (Proméga). La cassette d'expression constitutive est introduite dans la région E3, donnant pTG13231 (orientation sens) et pTG13232 (orientation anti-sens). Les virions sont produits selon la même méthodologie que ci-dessus.

EXEMPLE 5 : Evaluation *in vitro* du système inductible par GR^{dex}.

Les vecteurs de transfert pTG13064, pTG6242 et pTG13063 portant respectivement les cassettes CMV-GR^{dex}, LTR MMTV-FIX (sens) et LTR MMTV-FIX (anti-sens) sont transfectées de manière transitoire dans les cellules 293 (5µg d'ADN pour 10⁶ cellules). En outre, le plasmide pTG13064 est co-transfecté avec soit pTG6242 ou pTG13063. Les cultures sont poursuivies en présence de dexaméthasone (10⁻⁶ M) ou en son absence. Les surnageants cellulaires sont prélevés 48, 96, 120 et 144 heures après transfection et la quantité de FIX produite est déterminée par ELISA (kit Asserachrom ; Diagnostica Stago). Les résultats présentés dans la Figure 1 montrent une induction de la production de FIX en présence de l'activateur GR^{dex} activé par la dexaméthasone. Le récepteur exprimé par pTG13064 est donc fonctionnel dans la mesure où à l'état activé (en présence de dexaméthasone), il peut se fixer sur les motifs GRE du MMTV et induire la transcription du gène FIX. L'activité basale du système est très faible. En effet, la quantité de FIX produite en l'absence de dexaméthasone ou de pTG13064 est faible, voire négligeable.

La cinétique d'expression du FIX en fonction du temps montre que le niveau de production maximal est atteint 120 h après la transfection. Au delà, la concentration stagne ce qui peut s'expliquer par l'état des cellules (à confluence) et un appauvrissement du milieu et probablement en dexaméthasone.

5 L'efficacité du système a également été évalué par infection adénovirale en présence de dexaméthasone ou non. Les cellules hôtes non permissives Vero ou A549 sont infectées par les virions AdTG13083 ou AdTG13092 portant les cassettes CMV-GR^{dex} et MMTV-FIX (sens pour le premier virus et anti-sens pour le second) ou co-infectées par les adénovirus AdTG13075 (CMV-GR^{dex}) et
10 AdTG13082 (MMTV-FIX sens) ou AdTG13088 (MMTV-FIX anti-sens). On utilise une MOI (multiplicité d'infection) de 100 pour les expériences d'infection et 50 pour chacun des virus dans les cas de co-infection. La quantité de FIX produite dans les surnageants de culture est dosée par ELISA.

Dans les cellules Vero, l'expression du FIX n'est quantifiable qu'après
15 infection par les virions AdTG13092 portant les deux cassettes et en présence de l'inducteur. Aucune induction n'a lieu en absence de dexaméthasone ou du récepteur GR^{dex}. Il est à noter que ces cellules n'expriment pas le GR sauvage.

En cellule A549, le FIX est produit en présence de dexaméthasone dans les cellules infectées par AdTG13088 ou AdTG13092. Il est à noter que ces cellules
20 expriment le GR sauvage. Cependant le niveau de FIX est différé dans le temps en l'absence de GR^{dex} (virion AdTG13088).

En conclusion, le système inductible mettant en oeuvre le récepteur GR^{dex} et la dexaméthasone est fonctionnel dans les constructions dans lesquelles la cassette inductible MMTV-FIX est en orientation anti-sens (AdTG13088 et
25 AdTG13092). Par ailleurs, le système d'induction *en cis* (cassettes portées par un seul virus) est sensiblement plus productif qu'un système *en trans* mettant en oeuvre deux virus, notamment dans les cellules Vero.

Par ailleurs, l'étude a été reproduite en faisant varier les MOI. Les cellules

Vero sont infectées par le virus AdTG13092 à une MOI de 10, 50 ou 100. A titre de contrôle, on utilise l'AdTG13075. Le dosage du FIX est effectué 48 et 72 h après l'infection. On observe une production de FIX quelque soit la MOI employée, mais le niveau optimal d'expression est obtenu pour une MOI de 50.

- 5 On a également fait varier la concentration en inducteur de 10^{-9} à 10^{-5} M. A forte concentration, la dexaméthasone s'avère cytotoxique se traduisant par une moindre expression du FIX. A faible concentration (10^{-8} M et au delà), l'induction n'est pas efficace. L'optimum se situe à 10^{-7} M.

10 **EXEMPLE 6 : Evaluation *in vivo* du système inductible par GR^{dex}.**

- 15 Le virus AdTG13092 est injecté par voie intraveineuse à des souris immunocompétentes C57Bl/6 à raison de 4×10^8 ou 8×10^8 ui. La dexaméthasone est administrée aux animaux par voie intrapéritonéale à une concentration de 100 µg pendant 3 jours consécutifs (à J0, J1 et J2). Les sérum sont prélevés régulièrement à partir du 3ième jour suivant l'infection et la quantité de FIX produite est évaluée par ELISA. On observe dans ces conditions une production significative de FIX.

REVENDICATIONS

1. Système d'expression inductible comprenant :
 - 5 (i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel d'origine eucaryote ou virale, placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte, et
 - (ii) un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en*
10 *trans* par ledit activateur transcriptionnel.
2. Système d'expression selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel comprend au moins un domaine de trans-activation, un
15 domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand (DLL).
3. Système d'expression selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel comporte tout ou partie d'un domaine dérivé d'un récepteur d'hormones stéroïdes choisi parmi le groupe constitué par les récepteurs
20 oestrogène (ER), glucocorticoïde (GR), progestérone (PR), Vitamine D, ecdysone (EcR), minéralocorticoïde, androgène, hormone thyroïde, acide rétinoïque et acide rétinoïque X ou encore d'une immunophiline ou d'un récepteur aryl hydrocarbon (AhR).
4. Système d'expression selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit
25 activateur transcriptionnel est choisi parmi :
 - (i) un polypeptide désigné GR^{dex} comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivés d'un récepteur aux glucocorticoïdes, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment

- par substitution de l'isoleucine en position 747 par une thréonine ;
- (ii) un polypeptide désigné ER^T comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivé d'un récepteur à l'oestrogène, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment par substitution de la glycine en position 521 par une arginine ;
- (iii) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un DLL dérivé du récepteur à l'ecdysone, un domaine de liaison à l'ADN hybride dérivé de ceux des récepteurs EcR et GR et un domaine de trans-activation dérivé de la protéine virale VP16 et un second polypeptide dérivé de la protéine USP de drosophile ou d'un homologue tel que le récepteur de l'acide rétinoïque X (RXR) humain ;
- (iv) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un domaine de liaison à l'ADN dérivé du facteur de transcription ZFHD1 et un DLL dérivé de l'immunophiline FKBP12 et un second polypeptide comportant un domaine de trans-activation dérivé du facteur NF κ B p65 et un DLL dérivé de FRAP (FKBP12-rapamycine-associated protein) ; et
- (v) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide dérivé du récepteur AhR et un second polypeptide dérivé de la protéine Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator).

5. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce en ce que ledit activateur transcriptionnel comprend un DLL et un domaine de trans-activation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, notamment dérivé de la protéine de levure Gal4.

6. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel est activé par liaison d'un inducteur non naturel et

n'est pas ou peu activé par un composé humain naturel.

5

7. Système d'expression selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit inducteur non naturel est une substance synthétique administrable par voie orale.

10

8. Système d'expression selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit inducteur est choisi parmi le groupe constitué par la dexaméthasone, le tamoxifène, le muristérone A, l'ecdysone, la rapamycine et le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine ou un analogue de ces composés.

15

9. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt code pour un ARN anti-sens, un ribozyme, ou encore un polypeptide d'intérêt.

20

10. Système d'expression selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit polypeptide d'intérêt est choisi parmi le groupe constitué par les chémokines, les cytokines, les récepteurs cellulaires, les ligands, les facteurs de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, les facteurs de croissance, les enzymes, les inhibiteurs d'enzyme, les polypeptides à effet anti-tumoral, les polypeptides capables d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire ou virale, les polypeptides agissant sur l'apoptose, les agents cytostatiques, les immunoglobulines, les apolipoprotéines, les produits cytotoxiques, les produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, les antigènes associés aux tumeurs, les immunotoxines, les inhibiteurs d'angiogénèse et les marqueurs.

25

11. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que ledit promoteur inductible comprend une ou plusieurs séquence(s) cible(s) répondant à un activateur transcriptionnel tel que défini dans l'une des revendications 2 à 8.

12. Système d'expression selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite séquence cible est une séquence ERE, GRE, EcR, UAS, 5x_E/GRE, XRE ou une séquence cible répondant au facteur de transcription ZFDH-1.

5

13. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques et leurs éléments de régulation sont portés par ledit vecteur adénoviral recombinant.

10 14. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques et leurs éléments de régulation sont portés par un vecteur d'expression indépendant autre que ledit vecteur adénoviral recombinant.

15 15. Système d'expression selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit vecteur indépendant est un vecteur synthétique, un plasmide ou un vecteur viral, notamment dérivé d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus associé à l'adénovirus (AAV), d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus, d'un parvovirus, d'un poxvirus (fowlpox, canaripox, virus de la vaccine..) ou d'un foamyvirus.

20

16. Système d'expression selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et, le cas échéant, ledit vecteur adénoviral indépendant sont déficients pour la fonction E1 par délétion de tout ou partie de la région E1 ou mutation non fonctionnelle de cette dernière.

25

17. Système d'expression selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et/ou ledit vecteur adénoviral indépendant est/sont en outre déficient(s) pour au moins l'une des fonctions E2, E4, L1, L2, L3, L4 et/ou L5.

18. Système d'expression selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et/ou ledit vecteur adénoviral indépendant est/sont en outre dépourvu(s) de tout ou partie de la région non essentielle E3.
- 5
19. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et, le cas échéant, ledit vecteur indépendant sont sous forme de particules virales infectieuses.
- 10 20. Vecteur adénoviral recombinant comprenant
- (i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte, et
 - (ii) un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible
- 15 susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.
21. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 20, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques codent pour un activateur transcriptionnel selon l'une des revendications 2 à 6 ou pour un activateur transcriptionnel
- 20 procaryotique, notamment un polypeptide comprenant un DLL et un domaine de liaison à l'ADN dérivé d'un répresseur de l'opéron tétracycline.
22. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 21, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques codent pour le polypeptide tTA comprenant
- 25 un répresseur de l'opéron tétracycline (tetR) fusionné en phase à un domaine d'activation de la transcription dérivé de la protéine virale VP16.
23. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisé en ce que ledit inducteur non naturel est tel que défini dans la

revendication 7 ou 8 ou est constitué par la doxycycline ou la tétracycline.

24. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 23,
caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt est tel que défini dans la revendication 9
5 ou 10.

25. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 24,
caractérisé en ce que ledit promoteur inductible est tel que défini dans la
revendication 11 ou 12 ou comprend une ou plusieurs séquence(s) cible(s) tetO.
10

26. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 25,
caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant est tel que défini dans
l'une des revendications 16 à 18.

15 27. Particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral recombinant
selon l'une des revendications 20 à 26.

28. Procédé de préparation d'une particule virale selon la revendication 27, dans
lequel :

- 20 (i) on introduit un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des
revendications 20 à 26 dans une cellule de complémentation capable
de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une
cellule de complémentation transfectée,
(ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des
25 conditions appropriées pour permettre la production de ladite
particule virale, et
(iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

29. Cellule eucaryote comprenant un système d'expression selon l'une des
30 revendications 1 à 19, un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des

revendications 20 à 26 ou une particule virale infectieuse selon la revendication 27.

30. Composition pharmaceutique comprenant un système d'expression selon l'une des revendications 1 à 19, un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26, une particule virale infectieuse selon la revendication 27 ou
5 une cellule eucaryote selon la revendication 29 et un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

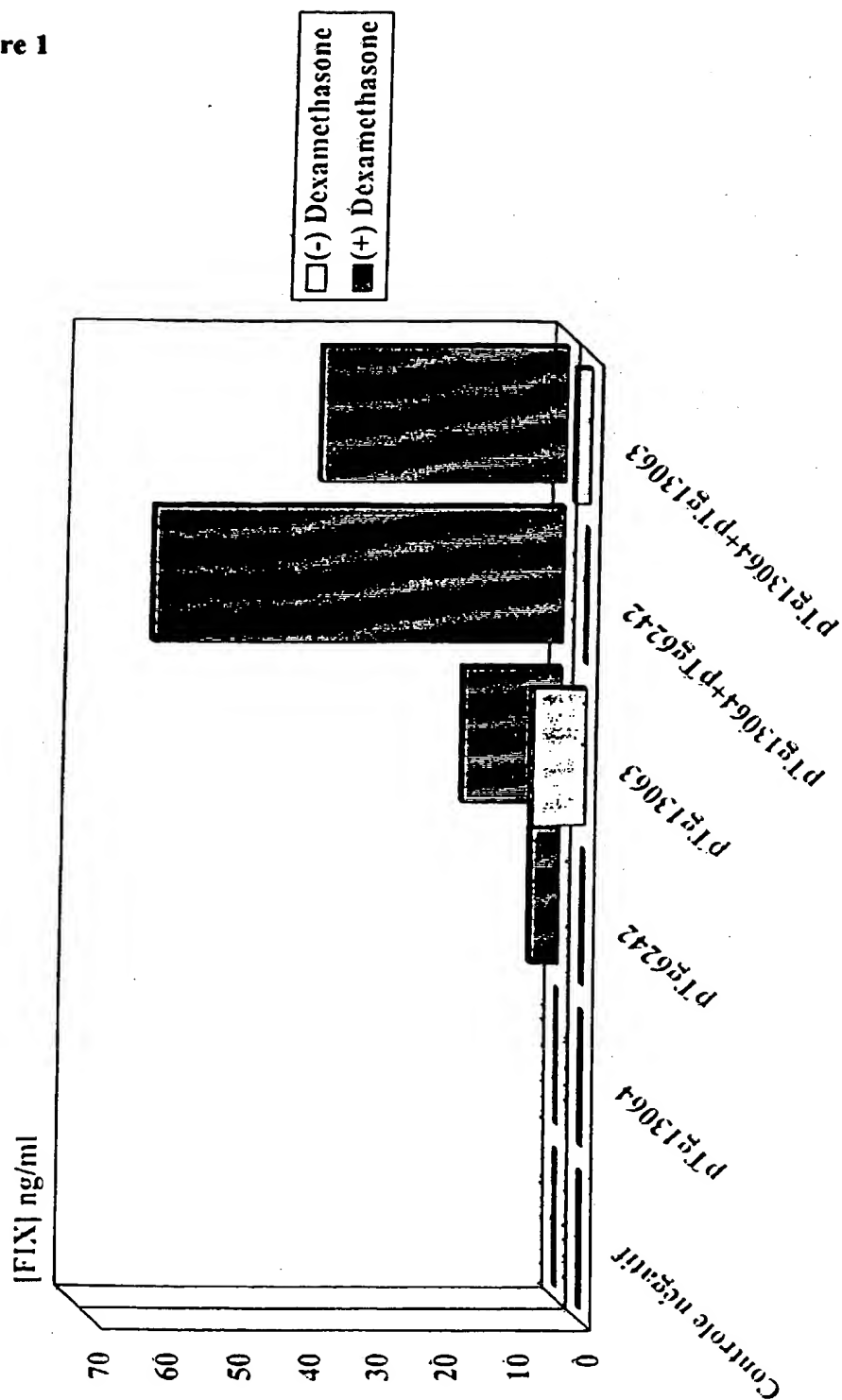
31. Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce en
10 ce qu'elle est sous forme injectable.

32. Utilisation d'un système d'expression selon l'une des revendications 1 à 19, d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26, d'une particule virale infectieuse selon la revendication 27 ou d'une cellule eucaryote
15 selon la revendication 29, pour la préparation d'un médicament destiné au transfert et à l'expression dudit gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte.

33. Utilisation d'un système d'expression selon l'une des revendications 1 à 19, d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26, d'une
20 particule virale infectieuse selon la revendication 27 ou d'une cellule eucaryote selon la revendication 29, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies par thérapie génique.

34. Activateur transcriptionnel comprenant un DLL et un domaine de trans-
25 activation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, notamment dérivé de la protéine de levure Gal4.

Figure 1



CABINET REGIMBEAU
ORIGINAL

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	NARUMI K ET AL : "Intermittent, repetitive corticosteroid-induced upregulation of platelet levels after adenovirus-mediated transfer to the liver of a chimeric glucocorticoid-responsive promoter controlling the thrombopoietin cDNA" BLOOD, vol. 92, no. 3, 1 août 1998, pages 822-833, XP002104566	1-3
Y	* abrégé *	4-19
X	SHIH W ET AL: "AN ADENOVIRAL VECTOR SYSTEM FOR FUNCTIONAL IDENTIFICATION OF NUCLEAR RECEPTOR LIGANDS" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 5, no. 2, 1 février 1991, pages 300-309, XP000386396	1-3
Y	* abrégé *	4-19
X	WO 98 37185 A (HU SHI XUE ;UNIV TEXAS (US); XU HONG JI (US); ZHOU YUNLI (US); LOG) 27 août 1998	20-33
Y	* revendication 29 *	4-19
X	BRASELMANN S ET AL: "A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 90, no. 5, 1 mars 1993, pages 1657-1661, XP002104567	34
Y	* figure 5 *	4-19
--- -/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
2 juin 1999		Lonnoy, 0
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE**

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

**N° d'enregistrement
national**

FA 566325
FR 9810842

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	WO 97 31108 A (ASS POUR LE DEV DE LA RECH ;BROCARD JACQUES BERTRAND (FR); CHAMBON) 28 août 1997 * revendication 14 *	4-19
Y	WO 97 38117 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI ;EVANS ROLAND M (US); NO DAVID (US)) 16 octobre 1997 * figure 2 *	4-19
Y	DANIELIAN P ET AL: "Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen." MOL. ENDOCRINOL., vol. 7, no. 2, février 1993, pages 232-240, XP002104568 * abrégé *	4-19
D,Y	ROUX S ET AL: "Mutation of Isoleucine 747 by a threonine alters the ligand responsiveness of the human glucocorticoid receptor" MOL. ENDOCRINOL., vol. 10, no. 10, octobre 1996, pages 1214-1226, XP002104569 * abrégé *	4-19
A	OLIGINO T ET AL: "Drug inducible transgene expression in brain using a herpes simplex virus vector" GENE THERAPY, vol. 5, no. 4, avril 1998, page 491-496 XP002104570	
A	EP 0 316 717 A (DAIICHI SEIYAKU CO) 24 mai 1989	
-/-		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
2 juin 1999		Lonnoy, 0
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2782732

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 566325
FR 9810842

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO 97 44475 A (LUSKY MONIKA ;MEHTALI MAJID (FR); LEROY PIERRE (FR); TRANSGENE SA) 27 novembre 1997 ---	
A	WO 96 30512 A (BRACCO LAURENT ;TOCQUE BRUNO (FR); RHONE POULENC RORER SA (FR); SC) 3 octobre 1996 -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
2 juin 1999		Lonnoy, 0
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)